

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/533, 33/58, C07D 271/12 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/67025 |
| | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: | 9. November 2000 (09.11.00) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03308 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. April 2000 (13.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 19 634.6 30. April 1999 (30.04.99) DE (71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt (DE). (72) Erfinder: MUELLER, Guenter; Im Haindell 1, D-65843 Sulzbach (DE). PETRY, Stefan; Johannesallee 12, D-65929 Frankfurt (DE). JORDAN, Holger; Magaretenhof 1, D-61276 Weilrod (DE). KLEINE, Horst; Lessingring 11, D-65795 Hattersheim (DE). WENZEL, Horst; Langes- trasse 23, D-60331 Frankfurt (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. | |
| (54) Title: DETERMINATION OF COMPLEX PHOSPHOLIPID/LIPID STRUCTURES USING SYNTHETIC FLUORESCENCE-MARKED ACYLGlycerIDES (54) Bezeichnung: BESTIMMUNG KOMPLEXER PHOSPHOLIPID/LIPID-STRUKTUREN MIT HILFE SYNTHETISCHER FLUORESCENZ-MARKIERTER ACYLGlycerIDE (57) Abstract The invention relates to a simple continuous test for identifying structures that favour the arrangement of aromatics for charge-transfer complexes, e.g. complex phospholipid/lipid structures (bilayer, monolayer, aggregates, micelles), using synthetic fluorescence-marked acylglycerides, and to their use for determining the activity of lipases/lipase inhibitors, to a monoacylglyceride for use in this test and to a method for producing the same, to the substrate obtained therefrom and to a method for producing said substrate. (57) Zusammenfassung Es ist ein einfacher kontinuierlicher Test zur Identifizierung von Strukturen, die die Anordnung von Aromaten zur Charge-Transfer-Komplexen begünstigen, wie z.B. komplexer Phospholipid/Lipidstrukturen (Bilayer, Monolayer, Aggregate, Mizellen), mit Hilfe synthetischer fluoreszenz-markierter Acylglyceride und dessen Anwendung zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen/Lipaschemmern beschrieben, ferner ein Monoacylglycerid zur Anwendung in diesem Test und ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie das daraus erhaltene Substrat und ein Verfahren zur Herstellung desselben. | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LJ | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Beschreibung

BESTIMMUNG KOMPLEXER PHOSPHOLIPID/LIPID-STRUKTUREN MIT HILFE SYNTHETISCHER FLUORESCENZ-MARKIERTER ACYLGLYCERIDE

5

Die Erfindung betrifft einen einfachen kontinuierlichen Test zur Identifizierung von Strukturen, die die Anordnung von Aromaten zur Charge-Transfer-Komplexen begünstigen, wie z.B. komplexer Phospholipid/Lipidstrukturen (Bilayer, Monolayer, Aggregate, Mizellen), mit Hilfe synthetischer fluoreszenz-markierter Acylglyceride und dessen Anwendung zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen/Lipasehemmern.

Lipasen, Phospholipasen und andere lipolytische Enzyme haben große Bedeutung im biotechnologischen und medizinischen Bereich. Bei gewissen Stoffwechselerkrankungen läßt sich erhöhte Lipaseaktivität im Fettgewebe nachweisen, die für die Pathogenese dieser Krankheit mit verantwortlich gemacht wird. Der größte Teil der Energiereserven des Körpers ist in Zellen des Fettgewebes als Fettsäuren der Triglyceride gespeichert. Die wesentlichen durch Insulin bewirkten anabolen Vorgänge umfassen die Stimulation der Aufnahme von Substraten für die Triglyceridsynthese und die Erhöhung der Lipogenese. Ein weiterer wichtiger durch Insulin hervorgerufener Prozeß ist die Hemmung der Lipolyse, der Vorgang durch den katabole Hormone, in erster Linie Katecholamine, die Hydrolyse von Triglyceriden stimulieren und dadurch die Freisetzung von Fettsäuren induzieren. Ein wesentliches Problem, welches mit nicht-insulin-abhängigem Diabetes Mellitus (NIDDM) verknüpft ist, hat seine Ursache in der ungehemmten Lipolyse der Fettzellen, die zu erhöhten Spiegeln an nicht veresterten Fettsäuren im Plasma führt. Nach gegenwärtiger Vorstellung stimulieren die Fettsäuren die Glukoneogenese in der Leber und vermindern die Glukoseutilisation im Skelettmuskel über noch schlecht charakterisierte molekulare Mechanismen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die Unterdrückung der Lipolyse in Fettzellen durch Hemmstoffe der Lipolyse, wie Agonisten des Nicotinsäurerezeptors der Fettzelle, sowohl die Fettsäurekonzentrationen im Plasma als auch einen erhöhten Blutzucker in diabetischen Tieren und Patienten senkt. Leider sind diese benefitären Effekte nicht besonders stark ausgeprägt und nur von relativ kurzer Dauer. Dies mag auf einer

- physiologischen Gegenregulation beruhen, hervorgerufen durch Eingriff in den Regelmechanismus des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Lipolyse, der hormon-sensitiven Lipase (HSL). Es gibt gute Gründe anzunehmen, daß die Hemmung der lipolytischen Reaktion zu einer verbesserten Therapie des NIDDM führen wird, wenigstens im Hinblick auf die Unterdrückung der Fettsäurefreisetzung aus den Fettzellen. Die direkte Hemmung der HSL durch geeignete Inhibitoren sollte dabei die offensichtlichen Schwierigkeiten eines Eingriffs in die komplexe Regulation der HSL umgehen.
- Die Aktivität lipolytischer Enzyme wird traditionell mit radiometrischen, titrimetrischen, enzymatischen oder fluorimetrischen/photometrischen Methoden untersucht. Radiometrische Assays sind am sensitivsten, aber sie erfordern teure radiomarkierte Substrate, sind diskontinuierlich und setzen die Abtrennung des radiomarkierten Substrats vom radiomarkierten Produkt voraus. Solche Trennungen sind oft lästig und die Vermeidung/Reduzierung von radioaktivem Abfall ist von steigender Bedeutung (relevant vor allem bei einer großen Zahl von Testen).
- Titrimetrische Tests sind kontinuierlich und können sowohl mit natürlichen- als auch synthetischen Substraten durchgeführt werden, sie leiden aber häufig unter einer recht geringen Sensitivität und sind anfällig gegenüber Bedingungen, die die Menge an freigesetzten Protonen beeinflussen.
- Enzymatische oder chromatographische Methoden zum Nachweis eines der Produkte der lipolytischen Reaktion (z.B. Glycerin) sind sehr empfindlich und relativ robust, aber auch umständlich in der Handhabung, da sie vor dem eigentlichen enzymatischen/chromatographischen Nachweis die Aufarbeitung des Inkubationsansatzes der Lipasereaktion voraussetzen. Die Kopplung an einen Enzymtest erlaubt nur Endpunktmessungen ("time-stop" Messung). Ferner kann bei der Untersuchung unbekannter Substanzen (z. B. Suche nach potentiellen Inhibitoren) eine Wirkung auf die Enzyme der Nachweisreaktion nicht prinzipiell ausgeschlossen werden und erfordert deshalb entsprechende Kontrollen.
- Diese Überlegungen gaben den Anstoß zur Entwicklung von fluorimetrischen/photometrischen Verfahren. Diese erreichen prinzipiell die Sensitivität von radiometrischen Methoden, erfordern aber den Einsatz von synthetischen mit Fluorophoren oder Chromophoren modifizierten Substraten oder Proben. Traditionelle fluorimetrische/photometrische Methoden sind wie die

radiometrischen Prozeduren diskontinuierlich im Ablauf und bedingen die Abtrennung des Substrats vom Produkt. In jüngerer Zeit wurden kontinuierliche fluorimetrische/photometrische Assays entwickelt (S. Hendrickson, *Analyt. Biochem* 219 (1994) 1-8), die auf einer Verschiebung des Fluoreszenz- bzw.

- 5 Extinktionsmaximums des Produkts im Vergleich zum Substrat basieren. Jedoch beschränken sich alle diese Verfahren auf den Nachweis von Phospholipasen, Lipoproteinlipase, Cholesterinesterase, Sphingomyelinase und Glukosyl-Ceramid-Glukosidase. Substrate mit fluorophoren/chromophoren Gruppen, geeignet für die kontinuierliche Aktivitätsmessung von Triglyzerid-spaltenden Enzymen (z.B. hormon-
- 10 sensitive Lipase, Monoglyceridlipase, Diglyceridlipase, Triglyceridlipase, Lipoproteinlipase, pankreatischen Lipase, hepatischen Lipase, bakteriellen Lipase, PLA₂, PLC, Cholesterinesterase) sind bisher nicht bekannt.

- Ziel der Erfindung ist es daher, einen einfachen kontinuierlichen Test zur
- 15 Identifizierung von Strukturen, die die Anordnung von Aromaten zur Charge-Transfer-Komplexen begünstigen, wie z.B. komplexer Phospholipid/Lipid-Strukturen (Bilayer, Monolayer, Aggregate, Mizellen), mit Hilfe synthetischer fluoreszenz-markierter Acylglyceride zu entwickeln sowie ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von lipidbindenden Proteinen, wie Lipasen.

- 20 Lipidtransporter sind Proteine, die Lipide erkennen und nicht wie Lipasen spalten, sondern stattdessen durch biologische Membranen transportieren.

- Unter Lipasen sind hier biologisch relevante körpereigene Lipasen zu verstehen, wie sie z.B. in R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* 110 (1998) 1694-1720 definiert
- 25 sind.

- Unter einem hormonsensitiven Enzym versteht man ein Enzym, das von sekundären Botenstoffen (z.B. cAMP) abhängiger Phosphorylierung oder über andere allosterische Mechanismen (z.B. Protein-Protein Wechselwirkung), die unter
- 30 Hormonkontrolle stehen, in seiner Aktivität beeinflusst wird. Hormone, die den c-AMP-Spiegel regulieren, sind beispielsweise Adrenalin, Noradrenalin, Glucagon und Insulin.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Substrats, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) eine mit einem Fluoreszenzlabel versehene Fettsäure mit 2,3-Epoxypropanol zu einem Monoacylglycerid in alkoholischer Lösung, wie z.B. C₁-C₄-Alkanol, bevorzugt Methanol, bei Raumtemperatur unter Zusatz einer Base, wie beispielsweise einer nicht nucleophilen anorganischen Base, bevorzugt Alkalicarbonat und Alkali-C₁-C₄-Alkanolate, besonders bevorzugt Methanolate, wie Natriummethanolat oder Kaliummethanolat, umsetzt,
- b) dieses Monoacylglycerid mit Phospholipiden im Verhältnis (mg/ml) 1:10 bis 10:1, bevorzugt 1:2 bis 3:1 und besonders bevorzugt 1:1 bis 1,5:1, einer Ultraschallbehandlung unterzieht, woraus das Substrat resultiert, das an einem Farbumschlag von gelb nach rot erkennbar ist.

Ein Fluoreszenzlabel wird definiert als eine chemische Gruppe innerhalb eines Moleküls, die nach Anregung durch Licht selbst zur Lichtemission befähigt ist. Solche Gruppen werden hier eingesetzt, um Substanzen herzustellen, die selbst in geringsten Konzentrationen von ca. 1nM noch nachweisbar sind. Erwähnt seien beispielsweise N,N-Dimethylaminosulfonsäure (Dansyl) oder NBD, bevorzugt NBD.

Unter einer Fettsäure versteht man beispielsweise eine langkettige Carbonsäure, gesättigt oder ungesättigt mit einer Kettenlänge von C-8 bis C-20, bevorzugt C-12, C-14, C-16 und C-18 gesättigt oder ungesättigt, besonders bevorzugt C-12 gesättigt.

Eine mit einem Fluoreszenzlabel versehene Fettsäure wurde mit 2,3-Epoxypropanol zu einem Monoacylglycerid gekoppelt. Aus diesem synthetischen Substrat und Phospholipiden, wie z.B. Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin allein oder gemeinsam, gegebenenfalls in einem Verhältnis nach Gewicht von 10:1 bis 1:10, bevorzugt 3:1 bis 1:3, besonders bevorzugt 2:1, wurden durch Ultraschallbehandlung, die beispielsweise ca. 1 bis 10 Minuten, bevorzugt 1 bis 6 Minuten, besonders bevorzugt 4 Minuten dauert, Micellen oder Vesikel gebildet, die als Substrat der zu untersuchenden Lipase dienen. Dieser Einbau in Micellen oder Vesikel ist mit einem Farbumschlag von gelb nach rot verbunden, beruhend auf einem Charge-Transfer-Komplex der in dieser Struktur räumlich eng benachbarten

Aromaten. Inkubation mit Lipase führt zur Abspaltung der Fettsäuren unter Freisetzung von markierter Fettsäure und Glycerin.

Als Phospholipide werden beispielsweise Phosphatidylcholin (6 mg) und
5 Phosphatidylinositol (6 mg) in Chloroform (je 1 ml) gelöst. Zur Herstellung des Substrats werden zwei Teile Phosphatidylinositollösung (z.B. 83.5 µl) und ein Teil Phosphatidylcholinlösung (z.B. 41.5 µl) und 100 µl NAG Lösung (10 mg in 1 ml Chloroform) zusammenpipettiert (Endkonzentration im Test: 0.0375 mg Phospholipid/ml; 0.05 mg/ NAG/ml). Nach Entfernen des Chloroform werden 20 ml
10 25 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl hinzugegeben und zwei Ultraschallbehandlungen mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier Type II, Standardmikrospitze, 25 W) durchgeführt: 1. Behandlung: Einstellung 2, 2 x 1 min, dazwischen jeweils 1 min auf Eis; 2. Behandlung: Einstellung 4, 2 x 1 min, dazwischen jeweils 1 min auf Eis. Während dieser Prozedur verändert sich die
15 Farbe der Substratlösung von gelb (Extinktionsmaximum 481 nm) nach rot (Extinktionsmaximum 550 nm) durch Interkalation von NAG zwischen die Phospholipidmoleküle der Vesikel/Micellen.

Die freie Fettsäure bildet keine Micellen oder Vesikel. Deshalb beobachtet man bei
20 der Abspaltung der Fettsäure von den Micellen/Vesikeln einen Farbumschlag von rot nach gelb. Somit wird die Zerstörung der Micellen/Vesikel und damit die Enzymaktivität der Lipase meßbar, entweder visuell (bei 481 nm, bzw. bei 550 nm), über die Farbänderung von rot nach gelb mit Hilfe eines Küvetten-Photometers (z.B. DU-640 der Firma Beckman (München)) oder eines Mikrotiterplattenlesegeräts (z.B. MicroBeta der Firma Wallac (Turku, Finnland) oder alternativ fluorimetrisch mit Hilfe
25 eines Phosphoimagers (z.B. Storm 840 der Firma Molecular Dynamics (Krefeld)), eines Fluoreszenzscanners (z.B. DA-2 der Firma Shimadzu (Osaka, Japan)) oder eines Bildauswerteverfahrens (z.B. ArrayScan der Firma Molecular Devices (USA)) welches auf einer CCD-Kamera (charge-coupled device), die einen integrierten
30 Schaltkreis zur Verarbeitung elektrischer und optischer Signale hat, bei dem die Information in Form elektrischer Ladungen gespeichert und weitergeleitet wird, beruht.

Alle diese Methoden werden bevorzugt in Verbindung mit einem Hochdurchsatzscreening (HTS) eingesetzt. Weitere Verfahren, die auf diesem Konzept beruhen, sind die Messung der Cytotoxizität von Verbindungen und der Wirkung von Detergentien.

5 Die Erfindung betrifft auch ein Substrat, hergestellt nach dem oben beschriebenen Verfahren und ein Substrat zur Anwendung in einem Verfahren zur Identifizierung von Strukturen, die die Anordnung von Aromaten zu Charge-Transfer-Komplexen begünstigen, bevorzugt zur Identifizierung von Phospholipid-/Lipidstrukturen, besonders bevorzugt von Lipasen/Lipasehemmern, wie oben beschrieben. Das
10 Verfahren kann auch zur Zerstörung von Mono- oder Bilayerstrukturen, gekrümmt (z.B. Micellen oder Vesikel) oder planar (z.B. künstlich erzeugter gerader Bilayer) eingesetzt werden, die durch eine Farbänderung begleitet ist. Die Farbänderung kann visuell/optisch bzw. fluorimetrisch meßbar verfolgt werden, wie oben
15 beschrieben.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung des Monoacylglycerids 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-2,3-dihydroxypropylester, wobei man 12-Aminolaurinsäure zunächst mit 7-Chlor-4-
20 nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol und anschließend das erhaltene Zwischenprodukt mit 2,3-Epoxypropanol in alkoholischer Lösung bei Raumtemperatur unter Zusatz einer Base, wie Alkalicarbonat und Alkali-C₁-C₄-Alkanolat, bevorzugt Methanolat, wie Natriummethanolat oder Kaliummethanolat, umsetzt, sowie das Monoacylglycerid 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-2,3-
25 dihydroxypropylester selbst.

Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch ein Verfahren zur Identifizierung von Lipasen/Lipasehemmern, deren Vorhandensein eine Farbänderung hervorruft, dadurch gekennzeichnet, daß man
30 a) ein Substrat wie oben beschrieben bereitstellt,
b) dieses Substrat mit einer Lipase (wie z.B. einer hormon-sensitiven Lipase, Monoglyceridlipase, Diglyceridlipase, Triglyceridlipase, Lipoproteinlipase, pankreatischen Lipase, hepatischen Lipase, bakteriellen Lipase, PLA₂, PLC, Cholesterinesterase, bevorzugt einer hormon-sensitiven Lipase und einer

pankreatischen Lipase, besonders bevorzugt einer hormon-sensitiven Lipase) inkubiert, und

c) die Farbänderung z.B. visuell/optisch oder fluorimetrisch bestimmt.

5 Gegenstand der Erfindung sind ferner Lipasen und Lipasehemmer, die durch vorstehend beschriebenes Verfahren identifiziert wurden.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen/Lipasehemmern, wobei man ein Substrat, wie oben beschrieben,

10 bereitstellt, dieses Substrat mit einer Lipase inkubiert, und die Geschwindigkeit der Farbänderung von rot nach gelb oder umgekehrt von gelb nach rot bestimmt und die Aktivität z.B. über eine Absorptionsmessung mit einem Photometer oder eine Fluoreszenzmessung mit einem Fluorimeter ermittelt.

15 Eine typische Reaktion wird beispielsweise in 1.5-ml Eppendorfgefäßen oder 96-Lochplatten für 60 min bei 30°C durchgeführt. 10 µl einer Testsubstanz (z. B. Inhibitoren der HSL) werden in Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl) in Gegenwart von 16.6 % DMSO vorgelegt. 180 µl der Substratlösung (20 µg/ml Phosphatidylcholin, 10 µg/ml Phosphatidylinositol, 50 µg/ml NAG in Assaypuffer)

20 werden hinzugegeben. Nach einer Vorinkubation für 15 min bei 30°C werden 20 µl HSL in Assaypuffer hinzupipettiert und die Extinktion bei 481 nm in einem Küvettenphotometer (0.5 ml-Küvette) bzw. Mikrotiterplattenlesegerät sofort gemessen (s.o.). Nach einer gewissen Inkubationszeit, die variabel ist und von der gewählten Enzymkonzentration abhängt und zwischen 2 und 240 Minuten betragen

25 kann, hier 60 min Inkubation bei 30°C wird die Extinktion erneut gemessen. Die Zunahme der Extinktion im Gelb-Bereich, hier bei 481 nm ist ein Maß für die Enzymaktivität.

Assay Systeme zur Identifizierung eines Lipasehemmers bzw. zur Bestimmung der

30 Aktivität einer Lipase/eines Lipasehemmers gehören ebenfalls zum Gegenstand der Erfindung. Sie enthalten ein Substrat wie oben beschrieben, eine Ultraschallvorrichtung und gegebenenfalls eine Vorrichtung zur visuellen/optischen und/oder fluorimetrischen Bestimmung der Farbänderung von rot nach gelb bzw. neben einem Substrat wie oben beschrieben und einer Ultraschallvorrichtung eine

Vorrichtung zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Farbänderung und eine Vorrichtung zur Absorptions- oder Fluoreszenzmessung.

Das Assay System kann auch in Form eines Kits vorliegen, wobei der Assay ein
5 Lipase-Assay ist.

Das Kit enthält ein Substrat wie oben beschrieben gegebenenfalls in einem Assaypuffer und ein Behältnis zur Durchführung des Tests, wie z.B. ein Eppendorfggefäß oder eine Mikrotiterplatte, bevorzugt eine Mikrotiterplatte.

10 Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen Verfahren zur Bestimmung von molekularen Transport/Transfersystemen, zur Messung der Detergenzwirkung von Verbindungen oder zur Untersuchung der Cytotoxizität von Verbindungen (Medikamenten u.ä.) enthaltend ein Substrat wie oben beschrieben und eine
15 Phospholipase, beispielsweise Phospholipasen A₂ (aus Schlangengift) oder C (Bacillus cereus).

Unter Transportern/Transferproteine versteht man Proteine, die zentrale Nährstoffe wie Kohlenhydrate, Lipide, und Proteine selbst erkennen und durch biologische
20 Membranen transportieren bzw. von einer bestimmten biologischen Membran zu einer anderen transferieren. Transporter/Transferproteine, beispielsweise isoliert aus Rattenileum, werden in Phospholipidvesikel (Liposomen) funktionell rekonstituiert (Proteoliposomen) bzw. als lösliche Polypeptide zusammen mit Liposomen inkubiert und dann zu einer wie oben beschriebenen Mischung aus Phospholipiden und NBD-
25 Glycerid gegeben und mit Ultraschall behandelt. Der Transportvorgang bzw. Transfervorgang des NBD-Glycerids von den NBD-Glycerid enthaltenden Micellen/Vesikeln in das Lumen der Proteoliposomen mit Hilfe der Transporter bzw. in die Membran der Liposomen mit Hilfe der Transferproteine führt zur Auflösung/Zerstörung der Micellenstruktur und kann wiederum photometrisch oder
30 fluorimetrisch wie oben beschrieben verfolgt werden.

Die Detergenzwirkung von chemischen Verbindungen beruht auf der direkten Zerstörung der Micellen/Vesikel. Da auch biologische Membranen derart aufgebaut sind, sind solche Verbindungen meist cytotoxisch. Eine Zerstörung von Micellen läßt

sich mit dem vorliegenden Verfahren leicht über die beschriebene Farbänderung nachweisen.

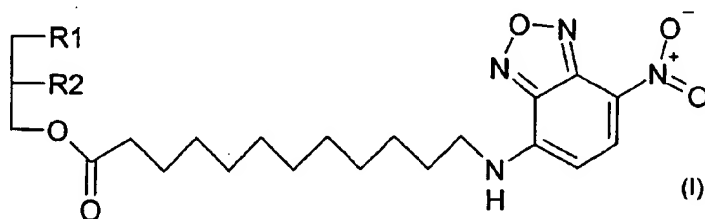
Synthesen:

5

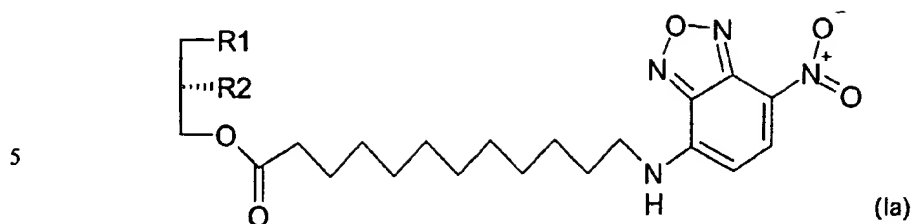
Einige NBD-markierte Fettsäuren wie auch 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure (1) sind zwar kommerziell erhältlich, aber teuer. Obwohl erste Experimente noch mit kommerziell erhältlichem Material durchgeführt wurden, konnte Verbindung (1) in guten Ausbeuten durch Umsetzung von 12-

10 Aminolaurinsäure mit 4-Chloro-7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol in MeOH erhalten werden.

Liste der Verbindungen 1 – 9:

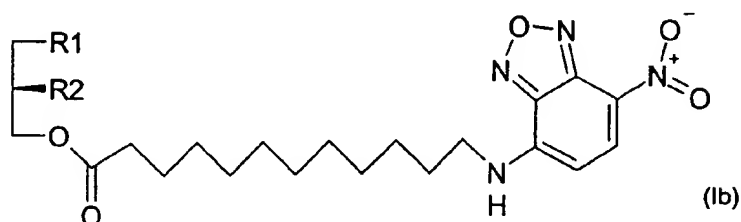


| | | | |
|----|---|---|---|
| 15 | 1 | 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure | |
| | 2 | 2,3-Epoxypropanol | |
| | 3 | $R_1 = \text{OH}$ | $R_2 = \text{OH}$ |
| | 4 | $R_1 = \text{OAc}$ | $R_2 = \text{OAc}$ |
| | 5 | $R_1 = \text{OOC}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ | $R_2 = \text{OOC}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ |
| 20 | 6 | $R_1 = \text{OOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ | $R_2 = \text{OH}$ |
| | 7 | $R_1 = \text{OOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ | $R_2 = \text{OAc}$ |
| | 8 | $R_1 = \text{O}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ | $R_2 = \text{O}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ |



9a $R_1, R_2 = \text{Isopropyliden}$

3a $R_1, R_2 = \text{OH}$



9b $R_1, R_2 = \text{Isopropyliden}$

3b $R_1, R_2 = \text{OH}$

Durch nucleophile Addition von (1) an 2,3-Epoxypropanol (2) konnte das
 15 Monoacylglycerid (3) in guten Ausbeuten erhalten werden. Verbindung (3) wurde
 anschließend acyliert um zu den Triglyceriden (4) und (5) zu gelangen. Durch
 Veresterung von (1) mit Palmitin wurde das Diacylglycerid (6) erhalten. Auch diese
 Verbindung wurde zum entsprechenden Triacylglycerid (7) umgesetzt. Die gleiche
 Methode wurde benutzt, um den Glycerindiether (8) zum Pseudotriacylglycerid (9)
 20 umzusetzen, in dem zwei Acylreste durch langkettige Ether ersetzt sind.

Alle synthetisierten Verbindungen erwiesen sich als Substrate der Lipasen,
 bevorzugt der HSL, zeigten aber erhebliche Aktivitätsunterschiede. Als "bestes"
 Substrat der Lipasen erwies sich das Monoacylglycerid (3). Die Einführung weiterer
 25 Acylgruppen, wie in den Verbindungen (4), (5), (6) und (7), führte zu einer Abnahme
 der Aktivität.

Dies kann leicht mit einer Konkurrenz der Abspaltung der NBD-Acylgruppe durch die neu eingeführten Acylreste erklärt werden. Um diese These zu erhärten, wurde ein Pseudotriacylglycerid (9) synthetisiert, in dem zwei Acylgruppen durch Hexadecylethereinheiten ersetzt sind. Diese können von den Lipasen nicht abgespalten werden und sollten deshalb nicht mit dem NBD-Fettsäureester konkurrieren. In biologischen Tests erwies sich diese Verbindung zwar als Substrat, allerdings mit geringer Aktivität. Offensichtlich besitzen die Lipasen neben dem katalytischen Bereich einen ausgedehnten für die langkettigen Ethergruppen zugänglichen hydrophoben Bindebereich, so daß die Anlagerung der Fettsäureeinheit behindert wird.

Da sich das Monoacylglycerid (3) als gutes Substrat der Lipasen erwies, wurde untersucht, ob es eine regioselektive Bevorzugung der Position 1 oder 3 gibt. Für diese Untersuchungen wurden die enantiomeren Regioisomeren (3a) und (3b) synthetisiert.

Die Synthese der Enantiomere (3a,b) geht aus von D- und L-1,2-O-Isopropylidenglycerin, das unter Dicyclohexylcarbodiimid-Aktivierung mit der NBD-markierten Fettsäure (1) verestert wird. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte mit 1 N methanolischer HCl. Beide Verbindungen zeigten gleiche biologische Aktivität, so daß der Einsatz enantiomerenreiner Verbindung keinen Vorteil verspricht.

1. 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodekansäure (1):
Zu einer Lösung von 12-Aminolaurinsäure (18 g, 83.7 mmol) in MeOH (300 ml) wird unter Rühren 30% ige Natriummethanolatlösung (14.5 ml, 76 mmol) gegeben. Nach 5 Minuten wird die Reaktionsmischung klar und man gibt eine Lösung von 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (15 g, 75 mmol) in MeOH (300 ml) zu. Man rührt die Reaktionsmischung, die sofort dunkel wird, für 18 h bei 25° C. Anschließend wird 1 M methanolische HCl (100 ml, 100 mmol) zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in MeOH aufgenommen, über Kieselgel filtriert, das Filtrat zur Trockne eingedunstet und der Rückstand durch Flashchromatographie (1 : 1 Toluol-EtOAc) gereinigt. Man erhält (1) als roten Feststoff (26.4 g, 93%);
R_F: 0.16 (1 : 1 Toluol-EtOAc).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 8.5 (d, 1 H, ArH), 6.35 (m, 1 H, NH), 6.18 (d, 1 H, ArH), 3.48 (dt, 2 H, CH₂NH₂), 2.36 (t, 2 H, CH₂COOH), 1,9-1,2 (m, 18 H, 9 CH₂). MS (ESI-MS) 379,2 (M+1).

5 2. 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-2,3-dihydroxypropylester (3):

Eine Lösung von Verbindung (1) (12 g, 31.7 mmol) und 2,3-Epoxypropanol (50 ml) in Isopropanol (50 ml) wird für 16 h bei 50° C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert, der Rückstand bei 0.01 Torr getrocknet und durch

10 Flashchromatographie (Diisopropylether, Ether, EtOAc) gereinigt. Man erhält Verbindung (3) als rotes Öl (10.3 g, 71.8%);

R_F: 0.18 (1:1 Toluol-EtOAc); R_F: 0.5 (30:5:1 CH₂Cl₂-MeOH-NH₃), das aus EtOAc-Diethylether kristallisiert.

15 ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 8.5 (d, 1H, ArH), 6.35 (m, 1 H, NH), 6.18 (d, 1 H, ArH), 4.19 (dd, 2 H, H-1, H-1'), 3.94 (m, 1 H, H-2), 3.65 (dd, 2 H, H-3, H-3'), 3.48 (dt, 2 H, CH₂NH₂), 2.35 (t, 2 H, CH₂COOH), 1,8 (m, 2 H, CH₂), 1.6 (m, 2 H, CH₂), 1.27-1.15 (m, 14 H, 7 CH₂). MS (ESI-MS) 453.4 (M+1).

20 3. 12-(7-Nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-(S)-2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethylester (9a):

Eine Lösung von Verbindung (1) (60 mg, 159 μmol) in CH₂Cl₂ (2 ml) wird mit Dicyclohexylcarbodiimid (160 mg, 770 μmol) versetzt und 30 min bei 25° C gerührt.

Anschließend gibt man eine Lösung von (R)-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-methanol (100 mg, 760 μmol) und Dimethylaminopyridin (94 mg, 770 μmol) in

25 CH₂Cl₂ (2 ml) zu und rührt die Reaktionslösung weitere 4 h bei 25° C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie (15: 1 Toluol-EtOAc) gereinigt. Verbindung (9a) wird als gelb fluoreszierendes Öl erhalten (46 mg, 58%).

R_F 0.29 (4:1 Toluol-EtOAc).

30 ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.5 (d, 1 H, arom.), 6.2 (m, 1 H, NH), 6.16 (d, 1 H, arom.), 4.31 (m, 1 H,), 4.1 (m, 3 H), 3.73 (dd, 1 H), 3.48 (dt, 2 H, CH₂NH₂), 2.35 (t, 2 H, CO-CH₂), 2.0-1.2 (m, 18 H, 9 CH₂), 1.42 (s, 3 H, CMe₂), 1.37 (s, 3 H, CMe₂).

4. 12-(7-Nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-(R)- 2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethylester (9b):

Verbindung (9b) wird wie für Verbindung (9a) beschrieben hergestellt. Verbindung (9b) wird als gelb fluoreszierendes Öl (51.4 mg, 65%) erhalten.

5 R_F 0.29 (4:1 Toluol-EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 8.5 (d, 1 H, ArH), 6.2 (m, 1 H, NH), 6.16 (d, 1 H, ArH), 4.31 (m, 1 H,), 4.1 (m, 3 H), 3.73 (dd, 1 H), 3.48 (dt, 2 H, CH_2NH_2), 2.32 (t, 2 H, CO-CH_2), 2.0-1.2 (m, 18 H, 9 CH_2), 1.42 (s, 3 H, CMe_2), 1.37 (s, 3 H, CMe_2).

10 5. 12-(7-Nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-(S)-2,3-dihydroxypropylester (3a) und 12-(7-Nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-(R)-2,3-dihydroxypropylester (3b):

Zu einer Lösung von 13.9 mg (28.2 μmol) Verbindung (9a) bzw. 17.8 mg (36.1 μmol) Verbindung (9b) in 25 ml Methanol gibt man methanolische HCl (1 M, 200 μl) und
15 rührt 1.5 h bei 25° C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie (2:1, 1:1 Toluol-EtOAc) gereinigt. Man erhält die Fettsäureester (3a) und (3b) in einer Ausbeute von 10.5 mg (82%), bzw. 9.3 mg (57%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)-Daten und Massenspektren sind identisch mit Verbindung (3).

20

6. Essigsäure-2-acetoxy-3-[12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)- dodecanoyloxy]-propylester (4):

Verbindung (3) (12 mg, 26.5 μmol) wird in 2:1 Pyridin/Acetanhydrid (3 ml) acetyliert. Nach 8 h engt man zur Trockne ein und reinigt den Rückstand durch Flashchroma-
25 tographie (1:2 Toluol-EtOAc). Man erhält Verbindung (4) als gelb fluoreszierendes Öl erhalten (13 mg, 91%).

R_F 0.66 (1:1 Toluol-EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 8.5 (d, 1 H, ArH), 6.3 (m, 1 H, NH), 6.18 (d, 1 H, ArH), 5.24 (m, 1 H), 4.92 (m, 1H), 4.34 (m) 4.28, 4.16, 3.48 (dt, 2 H, CH_2NH_2), 2.32 (CH_2COO), 2.1 (2 s, 6 H, 2 OAc) 2.0-1.0 (m, 18 H, 9 CH_2). MS (ESI-MS): 537,4 (M+1).

30

7. Hexansäure-2-hexanoyloxy-3-[12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecanoyloxy]-propyl ester (5):

Zu einer Lösung von Verbindung (2) (5 mg, 11 μ mol) in Pyridin (300 μ l) gibt man Hexansäureanhydrid (100 μ l) und läßt die Reaktionsmischung 16 h bei 25° C stehen.

5 Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie (9:1 Toluol-EtOAc) gereinigt. Man erhält Verbindung (5) als gelb fluoreszierendes Öl erhalten (1.8 mg, 25%).

R_F : 0.73 (1:1 Toluol-EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ . 8.5 (d, 1H ArH), 6.25 (m, 1 H, NH), 6.18 (d, 1 H, ArH),

10 5.26 (m, 1 H, H-2), 4.29 (dd, 2 H, H-3, H-3'), 4.15 (dd, 2 H, H-1, H-1'), 3.46 (dt, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.34 (t, 6 H, 3 CH_2COO), 1.63-1.2 (m, 12 H, 6 CH_2), 0.88 (m, 6 H, 2 CH_3).
MS (ESI-MS): 649.5 (M+1).

8. Hexadecansäure-2-hydroxy-3-[12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecanoyloxy]-propyl ester (6):

15 Eine Lösung von Verbindung (1) (25 mg, 66 μ mol), 4-Dimethylaminopyridin (9 mg, 73 μ mol) und 1,1-Carbonyldiimidazol (15 mg, 73 μ mol) in CH_2Cl_2 (5 ml) wird 30 min bei 25° C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie (9:1 Toluol-EtOAc) gereinigt. Man erhält Verbindung (6) als gelb fluoreszierendes Öl (9.5 mg, 21 %).

R_F 0.25 (5:1 Toluol-EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ . 8.54 (d, 1 H ArH), 6.3 (m, 1 H, NH), 6.19 (d, 1 H, ArH), 4.20 (dd, 2 H, H-1, H-1'), 4.15 (dd, 2 H, H-3, H-3'), 4.12 (m, 1 H, H-2), 3.5 (dt, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.36 (t, 4 H, 2 CH_2COO), 1.82 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.63 (m, 4 H, 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.47 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}$), 1.31-1.26 (m, 22 H, 11 CH_2), 1.287 (m, 2 H, CH_2), 1.26 (m, 2 H, CH_2), (m, 4 H, 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.31-1.26 (m, 18 H, 9 CH_2), 1.3 (m, 2 H, CH_2), 1.26 (m, 2 H, CH_2), 0.89 (t, 3 H, CH_3). MS (ESI-MS): 649.5 (M+1).

30 9. Hexadecansäure-2-acetyloxy-3-[12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecanoyloxy]-propyl ester (7):

Verbindung (6) (6 mg, 8.7 μ mol) wird acetyliert und aufgearbeitet, wie für Verbindung (4) beschrieben. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (9:1 Toluol-

EtOAc) gereinigt. Man erhält Verbindung (7) als gelb fluoreszierendes Öl (5.1 mg, 95%).

R_F 0.71 (5:1 Toluol-EtOAc).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 8.5 (d, 1 H, ArH), 6.25 (m, 1H, NH), 6.17 (d, 1 H, ArH), 5.25 (m, 1 H, H-2), 4.27 (dd, 2 H, H-1, H-3), 4.15 (dd, 2 H, H-1', H-3'), 3.73 (dt, 4 H, CH₂-NH), 2.3 (t, 2 H, CH₂COO), 2.08 (s, 3 H, OAc), 1.8 (m, 2 H, CH₂-CH₂-NH), 1.6 (m, 8 H, 4 CH₂), 1.4-1 (m, 32 H, 16 CH₂), 0.85 (t, 3 H, CH₃).

MS (FAB-MS): 739 (M+L1).

- 10 10. 12-(7-Nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure 2,3-bis-octadecyloxy-propyl ester (8):

Zu einer Lösung von Verbindung (1) (3 mg, 7.9 µmol), Dimethylaminopyridin (5 mg, 41 µmol) und Dicyclohexylcarbodiimid (5 mg, 24 µmol) in CH₂Cl₂ gibt man 2,3-Bis-octadecyloxypropan-1-ol (5 mg, 8.37 µmol). Die Reaktionsmischung wird 2 h bei 25° C gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie (2:1 Petrolether-Diethylether) gereinigt. Man erhält Verbindung (8) als gelb fluoreszierendes Öl (3.5 mg, 46%).

R_F 0.55 (3:7 Diethylether/Petrolether). MS (FAB-MS): 957.8 (M+1).

- 20 Enzympräparation:

Präparation der partiell gereinigten HSL:

Isolierte Rattenfettzellen werden aus Nebenhodenfettgewebe von nicht-behandelten männlichen Ratten (Wistar, 220-250 g) durch Kollagenasebehandlung gemäß

- 25 publizierter Verfahren gewonnen. Die Fettzellen aus 10 Ratten werden dreimal durch Flotation mit jeweils 50 ml Homogenisationspuffer (25 ml Tris/HCl, pH 7.4, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Antipain, 20 µg/ml Pepstatin) gewaschen und schließlich in 10 ml Homogenisationspuffer aufgenommen. Die Fettzellen werden im Teflon-in-Glas Homogenisator (Braun-Melsungen) durch 10 Hübe bei 1500 rpm und 15°C homogenisiert. Das Homogenisat wird zentrifugiert (Sorvall SM24-Röhrchen, 5000 rpm, 10 min, 4°C). Der Unterstand zwischen der oben liegenden Fettschicht und dem Pellet wird abgenommen und die Zentrifugation wiederholt. Der daraus resultierende Unterstand wird erneut zentrifugiert (Sorvall SM24-Röhrchen, 20000 rpm, 45 min, 4°C). Der

Unterstand wird abgenommen und mit 1 g Heparin-Sepharose (Pharmacia-Biotech, CL-6B, 5 x gewaschen mit 25 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) versetzt. Nach Inkubation für 60 min bei 4°C (in Intervallen von 15 min aufschütteln) wird der Ansatz zentrifugiert (Sorvall SM24-Röhrchen, 3000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wird
5 durch Zugabe von Eisessig auf pH 5.2 gebracht und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Präzipitate werden durch Zentrifugation (Sorvall SS34, 12000 rpm, 10 min, 4°C) gesammelt und in 2.5 ml 20 mM Tris/HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 65 mM NaCl, 13 % sucrose, 1 mM DTT, 10 µg/ml Leupeptin/Pepstatin/Antipain suspendiert. Die Suspension wird über Nacht bei 4°C gegen 25 mM Tris/HCl, pH 7.4, 50 % Glycerin,
10 1 mM DTT, 10 µg/ml Leupeptin, Pepstatin, Antipain dialysiert und dann auf eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen (0.1 g pro 1 ml Suspension, äquilibriert mit 10 mM Kaliumphosphat, pH 7.0, 30 % Glycerin, 1 mM DTT). Die Säule wird mit vier Volumina Äquilibrationpuffer bei einer Flußrate von 20 bis 30 ml/h gewaschen. Die HSL wird mit einem Volumen Äquilibrationpuffer, der 0.5 M Kaliumphosphat
15 enthält, eluiert, sodann dialysiert (s.o.) und 5- bis 10-fach konzentriert durch Ultrafiltration (Amicon Diaflo PM 10 Filter) bei 4°C. Die partiell gereinigte HSL kann 4 bis 6 Wochen bei -70°C aufbewahrt werden.

Präparation des NAG (NBD-Monoacylglycerid) Substrats:

20 6 mg Phosphatidylcholin und 6 mg Phosphatidylinositol werden in je 1 ml Chloroform gelöst. 10 mg NAG werden in 1 ml Chloroform gelöst. Zwei Teile Phosphatidylinositollösung (z.B. 83.5 µl) und ein Teil Phosphatidylcholinlösung (z.B. 41.5 µl) und 100 µl NAG Lösung werden in Plastikszintillationsgefäßen zusammenpipettiert (Endkonzentration im Test: 0.0375 mg Phospholipid/ml; 0.05
25 mg/ NAG/ml). Das Chloroform (225 µl Gesamtvolumen) wird durch Überblasen mit einem N₂-Strom komplett entfernt. Das getrocknete Substrat kann für bis zu 3 Tagen bei 4°C aufbewahrt werden. Zur Herstellung der Phospholipidvesikel/Micellen mit interkaliertem NAG (am Testtag) wird das getrocknete Substrat in 20 ml Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl) aufgenommen und zwei
30 Ultraschallbehandlungen mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier Type II, Standardmikrospitze): 1. Behandlung Einstellung 2, 2 x 1 min, dazwischen jeweils 1 min auf Eis; 2. Behandlung Einstellung 4, 2 x 1 min, dazwischen jeweils 1 min auf Eis. Während dieser Prozedur verändert sich die Farbe der Substratlösung von gelb (Extinktionsmaximum 481 nm) nach rot (Extinktionsmaximum 550 nm) durch

Interkalation von NAG zwischen die Phospholipidmoleküle der Vesikel/Micellen. Vor Benutzung als Substrat (innerhalb der nächsten 2 h) wird die Lösung noch 15 min auf Eis inkubiert.

5 Indirekter NAG Assay:

Der Assay wird in 1.5-ml Eppendorfgefäßen oder 96-Lochplatten für 60 min bei 30°C durchgeführt. Für das Auffinden von Inhibitoren der HSL werden 10 µl der Testsubstanz in Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl) in Gegenwart von 16.6 % DMSO vorgelegt. 180 µl der Substratlösung (20 µg/ml

10 Phosphatidylcholin, 10 µg/ml Phosphatidylinositol, 50 µg/ml NAG in Assaypuffer) werden hinzugegeben. Nach einer Vorinkubation für 15 min bei 30°C werden 20 µl der Enzymlösung in Assaypuffer (1- bis 4-fach verdünnt) hinzupipettiert und die Extinktion bei 480 nm in einem Küvettenphotometer (0.5 ml-Küvette) bzw. Mikrotiterplattenlesegerät (Microßeta, Wallac) sofort gemessen. Nach 60 min
15 Inkubation bei 30°C wird die Extinktion erneut gemessen. Die Zunahme der Extinktion bei 480 nm ist ein Maß für die Enzymaktivität. Unter Standardbedingungen führen 20 µg partiell gereinigte HSL zu einer Extinktionsänderung von 4000 arb. units.

20 Direkter NAG Assay:

Alternativ zur Messung der Extinktionsänderung der Substratlösung werden die Produkte der HSL Reaktion durch Phasentrennung/Dünnschichtchromatographie untersucht. Dazu wird der Inkubationsansatz (200 µl Gesamtvolumen, s. indirekter NAG Assay) in 2 ml Eppendorfgefäßen mit 1.3 ml Methanol/Chloroform/Heptan
25 (10:9:7) und anschließend mit 0.4 ml 0.1 M NaOH versetzt. Nach intensivem Mischen (10 sec) wird die Phasentrennung durch Zentrifugation (800xg, 20 min, Raumtemperatur) eingeleitet. Von der wässrigen oberen Phase werden äquivalente Volumen (z. B. 0.4 ml) abgenommen und die Extinktion photometrisch bei 481 nm bestimmt. Zur Dünnschichtchromatographie wird die wässrige Phase getrocknet
30 (SpeedVac) und dann in 50 µl Tetrahydrofuran aufgenommen. 5-µl Proben werden auf Silicagel Si-60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Chromatographie wird mit 78 ml Diethylether/22 ml Petroläther/1 ml Eisessig als Laufmittel durchgeführt. Die Menge an freigesetzter fluoreszierender NBD-Fettsäure wird durch Phosphorimaging (Molecular Dynamics, Storm 840 und ImageQuant Software) bei

einer Anregungswellenlänge von 460 nm und Emissionswellenlänge von 540-560 nm bestimmt.

TAG Assay:

- 5 Für die Herstellung des Substrats werden 25-50 μCi [^3H]Trioleoylglycerin (in Toluol), 6.8 μMol unmarkiertes Trioleoylglycerin und 0.6 mg Phospholipide (Phosphatidylcholin/Phosphatidylinositol 3:1 w/v) gemischt, über N_2 getrocknet und dann in 2 ml 0.1 M KPi (pH 7.0) durch Ultraschallbehandlung (Branson 250, Mikrospritze, Einstellung 1-2, 2 x 1 min im 1-min Intervall) aufgenommen. Nach
- 10 Zugabe von 1 ml KPi und erneuter Ultraschallbehandlung (4 x 30 sec auf Eis in 30-sec Intervallen) wird 1 ml 20% BSA (in KPi) hinzugefügt (Endkonzentration Trioleoylglycerin 1.7 mM). Für die Reaktion werden 100 μl Substratlösung zu 100 μl HSL-Lösung (HSL präpariert wie oben, verdünnt in 20 mM KPi , pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.02% BSA, 20 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin) pipettiert und für 30
- 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3.25 ml Methanol/Chloroform/Heptan (10:9:7) und von 1.05 ml 0.1 M K_2CO_3 , 0.1 M Borsäure (pH 10.5) wird gut gemischt und schließlich zentrifugiert (800xg, 20 min). Nach Phasentrennung wird ein Äquivalent der oberen Phase (1 ml) abgenommen und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt.

20

PNPB Assay:

- 10 μl p-Nitrophenylbutyrat (PNPB) (2 mM in Acetonitril), 890 μl 0.1 M KPi (pH 7.25), 0.9% NaCl, 1 mM DTT und 100 μl HSL (präpariert wie oben, verdünnt in diesem Puffer) werden für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3.25 ml
- 25 Methanol/Chloroform/Heptan (10:9:7, w/v) und kräftigem Schütteln wird zentrifugiert (800xg, 20 min) und für 3 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wird ein äquivalentes Volumen der oberen Phase abgenommen und die Absorption bei 400 nm bestimmt.

Tributyrin Assay:

- 30 Zur Herstellung des Substrats werden 5 μCi [$1\text{-}^{14}\text{C}$]Tributyrin (in Toluol) zu 1 ml von 20 mM unmarkiertem Tributyrin (in Acetonitril) gegeben. 10 μl dieser Substratlösung werden mit 390 μl 0.1 M KPi (pH 7.25), 0.9 % NaCl, 1 mM DTT, 2 % BSA und 100 μl HSL (präpariert wie oben, verdünnt in diesem Puffer) für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3.25 ml Methanol/Chloroform/Heptan (10:9:7, w/v) und von 1 ml

0.1 M NaOH wird kräftig gemischt und schließlich zentrifugiert (800xg, 20 min). Ein äquivalentes Volumen (1 ml) der oberen Phase wird abgenommen und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt.

5 Auswertung:

Substanzen werden üblicherweise in vier unabhängigen Ansätzen geprüft. Die Hemmung der enzymatischen Aktivität der HSL durch eine Testsubstanz wird durch den Vergleich mit einer nicht-gehemmten Kontrollreaktion bestimmt. Die Berechnung des IC_{50} -Wertes erfolgt über eine Hemmkurve mit mind. 10 Konzentrationen der Testsubstanz. Für die Analyse der Daten wird das Softwarepaket GRAPHIT, Elsevier-BIOSOFT (Version 3.0) benutzt.

Beispiele:

15 Beispiel 1: Kinetik der Spaltung von NAG durch HSL

NAG (0.05 mg/ml) wird mit den angegebenen Proteinmengen an partiell gereinigter HSL inkubiert (temperiertes Photometer) und zu bestimmten Zeiten die Extinktion bei 481 nm bestimmt. Zur Inaktivierung wird die HSL für 15 min bei 100°C inkubiert. (n = 8, mean \pm SD).

Ergebnis: Bis zu einer Proteinmenge von 20 μ g verläuft die Reaktion bis 60 min linear. Der Extinktionsunterschied beträgt hierbei 0.8-0.9 OD. Bei kleineren Proteinmengen ist Linearität bis 180 min gegeben.

Zunahme der Absorption bei 481 nm (arb. units)

| Zeit [min] | ohne HSL | inaktive HSL | HSL [5 µg] | HSL [10 µg] | HSL [20 µg] | HSL [40 µg] |
|------------|----------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 5 ± 2 | 4 ± 1 | 12 ± 2 | 19 ± 4 | 5 ± 7 | 91 ± 14 |
| 2 | 7 ± 2 | 5 ± 2 | 23 ± 4 | 51 ± 9 | 78 ± 12 | 89 ± 32 |
| 5 | 13 ± 4 | 10 ± 4 | 45 ± 9 | 102 ± 19 | 193 ± 36 | 395 ± 62 |
| 10 | 15 ± 3 | 12 ± 3 | 105 ± 18 | 185 ± 26 | 423 ± 62 | 784 ± 88 |
| 15 | 17 ± 5 | 15 ± 4 | 155 ± 20 | 288 ± 39 | 617 ± 70 | 1060 ± 144 |
| 20 | 19 ± 5 | 20 ± 5 | 219 ± 31 | 395 ± 36 | 865 ± 93 | 477 ± 182 |
| 30 | 19 ± 6 | 24 ± 7 | 295 ± 47 | 517 ± 67 | 1143 ± 216 | 2249 ± 286 |
| 45 | 23 ± 6 | 32 ± 6 | 453 ± 52 | 830 ± 57 | 1877 ± 206 | 2968 ± 321 |
| 60 | 25 ± 8 | 37 ± 9 | 677 ± 70 | 1179 ± 110 | 2510 ± 295 | 4065 ± 399 |
| 75 | 28 ± 9 | 39 ± 10 | 831 ± 92 | 1487 ± 104 | 3067 ± 310 | 4834 ± 462 |
| 90 | 31 ± 8 | 41 ± 13 | 995 ± 82 | 1844 ± 130 | 3527 ± 188 | 5472 ± 613 |
| 120 | 35 ± 7 | 45 ± 11 | 1455 ± 102 | 2745 ± 195 | 4941 ± 410 | 5702 ± 531 |
| 180 | 39 ± 11 | 52 ± 15 | 1937 ± 121 | 3521 ± 254 | 5712 ± 399 | 5961 ± 560 |

5

Beispiel 2: Abhängigkeit der Spaltung von NAG von der Menge an HSL

NAG (0.05 mg/ml) wird mit den angegebenen Proteinmengen an partiell gereinigter HSL für 60 min inkubiert. In Aliquots der Reaktionsansätze wird die Zunahme der Extinktion bei 481 nm (Entstehung der freien NBD-Fettsäure als Produkt der HSL-Reaktion = indirekter NAG Assay) oder die Abnahme der Extinktion bei 550 nm (Verbrauch von NAG als Substrat der HSL-Reaktion) bestimmt. Alternativ werden weitere Aliquots mit Methanol/Chloroform extrahiert und die in der organischen Phase enthaltene freigesetzte NBD-Fettsäure durch TLC-Analyse und Fluorimetrie (PhosphorImager Storm 840, Molecular Dynamics) bestimmt (= direkter NAG Assay)(n = 6, mean ± SD).

Ergebnis: Bis zu einer Proteinmenge 20 µg verläuft die Reaktion hinsichtlich der Produktentstehung (Extinktionszunahme bei 481 nm oder Auftreten freier NBD-Fettsäure gemäß TLC-Analyse) als auch hinsichtlich des Substratverbrauchs (Extinktionsabnahme bei 550 nm) linear. Die Übereinstimmung zwischen indirektem und direktem NAG Assay spricht für die Analyse der Spaltung von NAG im indirekten Assay.

Absorptionsänderung [arb. units]

| HSL Menge [µg] | Zunahme [481 nm] | Abnahme [550 nm] | freigesetzte NBD-FA [550 nm] |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|
| 0 | 0 | 885 ± 80 | 0 |
| 1 | 156 ± 21 | 866 ± 94 | 17 ± 2 |
| 2 | 347 ± 40 | 841 ± 78 | 44 ± 5 |
| 5 | 791 ± 88 | 779 ± 82 | 103 ± 11 |
| 7,5 | 1066 ± 120 | 759 ± 69 | 157 ± 21 |
| 10 | 1255 ± 141 | 650 ± 61 | 215 ± 24 |
| 15 | 2351 ± 205 | 540 ± 55 | 320 ± 29 |
| 20 | 2867 ± 199 | 287 ± 51 | 432 ± 53 |
| 25 | 3428 ± 270 | 198 ± 44 | 544 ± 61 |
| 30 | 3973 ± 244 | 115 ± 35 | 616 ± 56 |
| 40 | 4623 ± 511 | 91 ± 19 | 693 ± 67 |
| 60 | 5466 ± 602 | 62 ± 17 | 733 ± 80 |
| 80 | 5913 ± 485 | 54 ± 15 | 746 ± 98 |

5

Beispiel 3: Abhängigkeit der Spaltung von NAG durch HSL von der Substratkonzentration

Unterschiedliche Mengen von NAG (bei konstantem Verhältnis zu den

- 10 Phospholipiden) werden mit den angegebenen Mengen an partiell gereinigter HSL für 60 min inkubiert und dann die Extinktion bei 481 nm bestimmt (n = 5, mean ± SD).

- Ergebnis: Die Spaltungsgeschwindigkeit zeigt bei allen drei Enzymmengen den Verlauf einer typischen Sättigungskurve. Aufgrund der enzymatischen Besonderheit der HSL Reaktion ("zweidimensionale" Substratpräsentation, "interfacial activation")
- 15 läßt sich jedoch nur bei 5 µg Protein und den niedrigsten Substratkonzentrationen ein annähernd lineare Abhängigkeit feststellen. Ein vernünftiger Kompromiß zwischen Substratabhängigkeit und Signalstärke (OD 0.6 bis 0.7) stellt die Kombination von 20 µg Protein und 0.05 mg/ml NAG dar.

Zunahme der Absorption bei 481 nm (arb. units)

| NAG [mg/ml] | HSL [5 µg] | HSL [20 µg] | HSL [40 µg] |
|-------------|------------|-------------|--------------|
| 0,002 | 61 ± 9 | 194 ± 23 | 525 ± 77 |
| 0,005 | 109 ± 17 | 342 ± 58 | 1420 ± 122 |
| 0.01 | 227 ± 31 | 852 ± 77 | 2745 ± 264 |
| 0.02 | 388 ± 45 | 1758 ± 195 | 6705 ± 532 |
| 0.05 | 705 ± 61 | 3002 ± 409 | 11547 ± 912 |
| 0.075 | 1121 ± 107 | 768 ± 502 | 15502 ± 1077 |
| 0.1 | 1521 ± 119 | 6124 ± 577 | 19223 ± 1599 |
| 0.15 | 1983 ± 155 | 7544 ± 603 | 26730 ± 2069 |
| 0.2 | 2242 ± 186 | 8898 ± 961 | 31641 ± 2304 |
| 0.3 | 2489 ± 213 | 9734 ± 825 | 35953 ± 3355 |

5

Beispiel 4: Abhängigkeit der Spaltung von NAG durch HSL vom Verhältnis NAG und Phospholipide

NAG (0.05 mg/ml) wird mit unterschiedlichen Mengen an Phospholipiden

10 (Gesamtmenge) unter den angegebenen Verhältnissen von Phosphatidylinositol zu Phosphatidylcholin durch Ultraschallbehandlung als Substrat präpariert und dann mit partiell gereinigter HSL (20 µg) für 60 min inkubiert. Die Zunahme der Extinktion bei 481 nm wird bestimmt (n = 4, mean ± SD).

Ergebnis: Die Enzymgeschwindigkeit ist am größten bei einem PI/PC Verhältnis
 15 (nach Gewicht) von 3:1 und 0.0375 bis 0.075 Gesamtphospholipid. Der ausgeprägte Optimumsverlauf für die Gesamtkonzentration der Phospholipide wie auch für deren Zusammensetzung spricht für die Bedeutung der Präsentation der Substrate der HSL (hier NAG) in Phospholipidvesikeln und/oder Micellen bzw. für die Ausbildung eines Monolayers aus Phospholipiden auf dem (neutralen) Core des Substrats.

20

Zunahme der Absorption bei 481 nm (arb. units)

| Phosphatidylinositol/ cholin (mg/ml) | PI:PC 3:1 | PI:PC 1:1 | PI:PC 1:3 |
|---|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 173 \pm 42 | 134 \pm 23 | 89 \pm 12 |
| 0.009 | 1437 \pm 132 | 548 \pm 76 | 289 \pm 77 |
| 0.018 | 2610 \pm 306 | 1430 \pm 188 | 692 \pm 94 |
| 0.025 | 2980 \pm 254 | 1879 \pm 205 | 1158 \pm 121 |
| 0.0375 | 3144 \pm 277 | 1649 \pm 170 | 1230 \pm 105 |
| 0.075 | 3365 \pm 402 | 1138 \pm 125 | 1679 \pm 143 |
| 0.15 | 2108 \pm 256 | 745 \pm 97 | 912 \pm 103 |
| 0.3 | 913 \pm 102 | 335 \pm 47 | 427 \pm 56 |

5

Beispiel 5: Vergleich des indirekten/direkten NAG Assays mit einem konventionellen HSL Assay durch die Bestimmung der IC₅₀-Werte für verschiedene Inhibitoren

- 10 NAG (0.05 mg/ml) wird mit 20 µg partiell gereinigter HSL für 60 min in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen (0.1 bis 100 µM) an verschiedenen Substanzen inkubiert. In Aliquots der Ansätze wird die Extinktion bei 481 nm bestimmt (indirekter Assay) oder die freigesetzte NBD-FA durch Chloroform/Methanol extrahiert und durch TLC Analyse und Fluorimetrie bestimmt (direkter Assay). Alternativ wird
- 15 [³H]Trioleoylglycerol mit partiell gereinigter HSL gemäß publizierter Bedingungen inkubiert und das freigesetzte radiomarkierte Oleat nach Extraktion mit Chloroform/Methanol durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Aus den Hemmkurven bestimmt man die IC₅₀-Werte (n = 6, mean \pm SD).

Ergebnis: Für alle getesteten Substanzen wurden mit den drei Verfahren typisch

20 sigmoidale Hemmkurven ermittelt. Die IC₅₀-Werte lagen beim indirekten/direkten NAG Assay (Extinktionszunahme bei 481 nm / Freisetzung der NBD-Fettsäure) generell um den Faktor 4 bis 10 niedriger gegenüber der Spaltung von Trioleoylglycerin durch HSL, die Rangfolge der Inhibitoren (gemäß ihrer IC₅₀-Werte) ist jedoch identisch für alle drei Verfahren. Dies bestätigt publizierte Befunde, daß

25 die Wirkung von Inhibitoren der HSL von der Art des Substrats und der Substratpräsentation abhängt. Darüberhinaus können sich auch die effektiven Substratkonzentrationen (NAG und Trioleoylglycerid) zwischen den beiden Assays

unterscheiden (aufgrund der Substratpräparation als Vesikel oder Mizellen kaum bestimmbar) und damit bei kompetitiven Inhibitoren diese Unterschiede erklären. Die nahezu identischen IC_{50} -Werte, die gemäß der Extinktionsänderung und der NBD-Fettsäure-Freisetzung ermittelt wurden, sprechen für Spaltung von NAG durch HSL und damit Freisetzung von NBD-Fettsäure als Ursache für die Extinktionszunahme bei 481 nm, d.h. der NAG Assay erfaßt die lipolytische Spaltung von Lipiden.

 IC_{50} [μ M]

| Compound | NAG-Assay | freigesetzte NBD-FA | TAG-Assay |
|----------|------------------|---------------------|-------------------|
| 1 | $0,78 \pm 0,24$ | $0,78 \pm 0,15$ | $5,21 \pm 1,44$ |
| 2 | $0,75 \pm 0,18$ | $0,81 \pm 0,27$ | $12,12 \pm 3,20$ |
| 3 | $1,52 \pm 0,33$ | $1,02 \pm 0,25$ | $15,34 \pm 2,43$ |
| 4 | $2,45 \pm 0,41$ | $2,98 \pm 0,49$ | $18,25 \pm 3,54$ |
| 5 | $2,79 \pm 0,59$ | $3,58 \pm 0,39$ | $18,95 \pm 2,31$ |
| 6 | $3,42 \pm 0,78$ | $4,45 \pm 0,22$ | $21,45 \pm 3,06$ |
| 7 | $3,82 \pm 0,61$ | $4,51 \pm 0,34$ | $33,13 \pm 2,88$ |
| 8 | $4,29 \pm 0,58$ | $5,09 \pm 0,94$ | $35,94 \pm 3,18$ |
| 9 | $6,37 \pm 0,72$ | $6,94 \pm 0,55$ | $39,82 \pm 2,95$ |
| 10 | $7,51 \pm 1,22$ | $7,77 \pm 1,19$ | $47,85 \pm 4,12$ |
| 11 | $17,94 \pm 2,15$ | $21,33 \pm 2,83$ | $78,91 \pm 5,66$ |
| 12 | $22,38 \pm 2,47$ | $26,10 \pm 3,82$ | $116,34 \pm 9,42$ |

Beispiel 6: Vergleich des indirekten NAG Assays mit den Assays für TAG, PNPB und Tributyrin

NAG (0.05 mg/ml) wird mit 20 μ g partiell gereinigter HSL für 60 min in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen (0.1 bis 100 μ M) an verschiedenen Substanzen inkubiert. In Aliquots der Ansätze wird die Extinktion bei 481 nm bestimmt (indirekter Assay). Alternativ wird [3 H]Trioleoylglycerol (TAG), *p*-Nitrophenylbutyrat (PNPB) oder [14 C]Tributyrin mit partiell gereinigter HSL inkubiert und das freigesetzte radiomarkierte Oleat, *p*-Nitrophenol bzw. Butyrat nach Extraktion mit Chloroform/Methanol durch Flüssigszintillationsmessung bzw. Photometrie bestimmt. Aus den Hemmkurven werden die IC_{50} -Werte bestimmt ($n = 5$, mean \pm SD).

Ergebnis: Die relative Rangfolge der Inhibitoren, manifestiert in den IC_{50} -Werten, ist für die beiden Assays mit Lipidsubstrat (NAG und TAG) identisch. Dies gilt

grundsätzlich auch für die wasserlöslichen Substrate, Tributyrin und PNPB, doch sind einige Wirkstoffe, die die HSL-Aktivität gegenüber NAG und TAG signifikant reduzieren, unwirksam in der Hemmung der HSL gegenüber Tributyrin und PNPB. Dies läßt sich erklären mit einer Interferenz dieser Hemmstoffe mit der Lipidbindung der HSL (durch die Lipidbindungsdomäne), während der katalytische Mechanismus nicht beeinträchtigt wird. Wasserlösliche Substrate werden deshalb von der HSL auch in Gegenwart dieser Hemmstoffe gespalten. Die IC_{50} -Werte für Inhibitoren, die auch bei wasserlöslichen Substraten wirken, liegen generell zwischen denen für NAG und TAG als Substrat. Dies zeigt, daß sich NAG als "lipidartiges" Substrat für die HSL ähnlich den authentischen Triglyzeriden verhält und der NAG-Assay eingesetzt werden kann zum Auffinden von Hemmstoffen, die die Lipidbindung (wie auch den katalytischen Mechanismus) der HSL blockieren.

 IC_{50} [μ M]

| Compound | NAG-Assay | Tributyrin-Assay | PNPB-Assay | TAG-Assay |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | $0,85 \pm 0,19$ | $2,56 \pm 0,45$ | $3,56 \pm 0,67$ | $7,45 \pm 1,36$ |
| 2 | $1,06 \pm 0,22$ | $3,14 \pm 0,38$ | $5,03 \pm 0,93$ | $13,42 \pm 2,44$ |
| 3 | $2,14 \pm 0,29$ | > 100 | > 100 | $17,32 \pm 1,96$ |
| 4 | $3,18 \pm 0,51$ | > 100 | $93,61 \pm 7,92$ | $20,45 \pm 2,45$ |
| 5 | $2,96 \pm 0,47$ | $4,09 \pm 0,59$ | $10,45 \pm 0,66$ | $25,34 \pm 3,60$ |
| 6 | $3,89 \pm 0,38$ | $65,54 \pm 7,12$ | > 100 | $27,31 \pm 4,05$ |
| 7 | $4,56 \pm 0,61$ | $37,99 \pm 6,35$ | $75,34 \pm 6,93$ | $30,23 \pm 3,66$ |
| 8 | $4,94 \pm 0,51$ | $7,88 \pm 1,12$ | $12,55 \pm 2,13$ | $35,47 \pm 4,05$ |
| 9 | $7,24 \pm 0,64$ | $12,56 \pm 3,05$ | $19,87 \pm 3,44$ | $40,56 \pm 3,55$ |
| 10 | $8,55 \pm 0,59$ | $92,56 \pm 8,45$ | > 100 | $52,38 \pm 4,98$ |
| 11 | $20,45 \pm 3,05$ | > 100 | $90,45 \pm 8,52$ | $85,67 \pm 7,34$ |
| 12 | $26,78 \pm 3,67$ | $88,93 \pm 7,75$ | > 100 | > 100 |

Beispiel 7: Einfluß von verschiedenen Detergentien und Lösungsmittel auf die Substratstabilität

NAG (0.05 mg/ml) wird in Gegenwart steigender Konzentrationen verschiedener Detergentien und Lösungsmittel für 180 min bei 37°C inkubiert und dann die Extinktionsabnahme bei 550 nm (Auflösung der spez. Substratstruktur) bestimmt (n = 4, mean \pm SD).

Ergebnis: Das Substrat (Phospholipid-Vesikel bzw. Micellen) zeigte gegenüber den eingesetzten Agenzien unterschiedliche Empfindlichkeit. Die Extinktion, d.h. die Menge an Substrat verringerte sich in Gegenwart von 1 % DMSO um 10 %, bei 5 Äthanol oder Methanol um max. 20 %, bei 1 % TX-100 oder SDS um max. 30 %. Am effizientesten in der Auflösung der Vesikel/Micellen war DMF, bei 1 % waren über 80 % von NAG aus den Phospholipid/Vesikel Strukturen freigesetzt. Die Rangfolge in der Effizienz der eingesetzten Lösungsmittel und Detergentien in der Auflösung der Substratstruktur ist kompatibel mit einer Verschiebung des Extinktionsmaximum (von 10 481 nm zu 550 nm) von NAG, bzw. der chromophoren Gruppe (NBD) durch Einbau in die apolare Umgebung von Phospholipidvesikel/-micellen und der dadurch bedingten Entfernung aus wässriger Umgebung. Freisetzung von NAG aus diesen Strukturen in wässriges Milieu durch Auflösung der Vesikel/Micellen (z.B. durch Detergentien) oder Freisetzung der chromophoren Gruppe als NBD-Fettsäure durch 15 lipolytische Spaltung (durch HSL) von NAG führt zu einer Verringerung der Extinktion bei 550 nm und einer Zunahme der Extinktion bei 481 nm. Mit der Stabilität bei 1 % DMSO erfüllt das NAG Substrat eine der Grundvoraussetzungen für einen robusten HTS Assay.

20

Absorption bei 550 nm (arb. units)

| Conc. [%] | DMSO | DMF | TX-100 | SDS | Äthanol | Methanol |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 3102 ± 288 | 3204 ± 259 | 3067 ± 284 | 3150 ± 321 | 3096 ± 241 | 3199 ± 280 |
| 0,05 | 3003 ± 259 | 3121 ± 294 | 3166 ± 308 | 3063 ± 288 | 3147 ± 288 | 3056 ± 243 |
| 0,1 | 3199 ± 302 | 2655 ± 308 | 3247 ± 253 | 2935 ± 254 | 3056 ± 213 | 3102 ± 276 |
| 0,2 | 2984 ± 273 | 1952 ± 299 | 3119 ± 277 | 2769 ± 275 | 3097 ± 253 | 2945 ± 241 |
| 0,5 | 3055 ± 289 | 1234 ± 234 | 2954 ± 248 | 2506 ± 301 | 2995 ± 231 | 2683 ± 210 |
| 1 | 2845 ± 254 | 654 ± 112 | 2154 ± 199 | 2296 ± 252 | 2834 ± 256 | 2534 ± 191 |
| 2 | 2317 ± 266 | 251 ± 82 | 956 ± 101 | 1413 ± 178 | 2510 ± 194 | 1985 ± 165 |
| 5 | 1432 ± 187 | 105 ± 42 | 489 ± 77 | 603 ± 89 | 1935 ± 163 | 1438 ± 121 |
| 10 | 372 ± 51 | 38 ± 10 | 167 ± 45 | 102 ± 12 | 873 ± 103 | 475 ± 92 |

Beispiel 8: Einfluß von verschiedenen Detergentien und Lösungsmittel auf die Aktivität der HSL

- 5 NAG (0.05 mg/ml) wird mit HSL (20 µg) in Gegenwart steigender Konzentrationen verschiedener Agenzien für 60 min inkubiert. Die Extinktion bei 481 nm wird bestimmt ($n = 4$, mean \pm SD).
- Ergebnis: DMSO bis 1 % reduzierte die Menge an freigesetzter NBD-FA um etwa 10 %. Da bei dieser DMSO-Konzentration bis zu 10 % NAG aus den
- 10 Phospholipidvesikeln/-micellen durch Auflösung der Strukturen freigesetzt werden, ergibt sich rechnerisch eine Abnahme der Enzymaktivität um 20 %. Bei 0.5 % DMSO beträgt die Reduktion noch 10 %. TX-100, Aceton, Äthanol und Methanol bewirken zwischen 0.1 und 1 % eine Erhöhung der HSL-Aktivität, möglicherweise hervorgerufen durch eine effizientere Substratpräsentation. Bei hohen
- 15 Konzentrationen interferieren sie mit der Aktivität. DMF führt bereits bei Konzentrationen ab 0.1 % zu einem signifikanten Aktivitätsverlust der HSL.

Absorption bei 481 nm (arb. units)

| Conc. [%] | DMSO | DMF | TX-100 | Aceton | Äthanol | Methanol |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 | 3534 \pm 310 | 3427 \pm 213 | 3451 \pm 231 | 3325 \pm 300 | 3510 \pm 329 | 3523 \pm 358 |
| 0,05 | 3423 \pm 286 | 3365 \pm 256 | 3642 \pm 296 | 3948 \pm 325 | 3776 \pm 253 | 3421 \pm 290 |
| 0,1 | 3320 \pm 319 | 2576 \pm 278 | 4164 \pm 366 | 4487 \pm 376 | 4093 \pm 387 | 3341 \pm 265 |
| 0,2 | 3301 \pm 276 | 1321 \pm 154 | 4976 \pm 403 | 5876 \pm 452 | 4894 \pm 325 | 3150 \pm 302 |
| 0,5 | 3199 \pm 235 | 657 \pm 102 | 4065 \pm 312 | 6924 \pm 537 | 4231 \pm 296 | 2317 \pm 194 |
| 1 | 3156 \pm 196 | 210 \pm 78 | 2156 \pm 214 | 5421 \pm 325 | 3541 \pm 294 | 1948 \pm 164 |
| 2 | 1488 \pm 213 | 134 \pm 55 | 1254 \pm 143 | 2956 \pm 132 | 2143 \pm 215 | 1537 \pm 78 |
| 5 | 945 \pm 169 | 87 \pm 32 | 548 \pm 77 | 1523 \pm 72 | 1327 \pm 143 | 932 \pm 93 |
| 10 | 272 \pm 42 | 14 \pm 5 | 315 \pm 39 | 505 \pm 49 | 423 \pm 55 | 675 \pm 70 |

Beispiel 9: Spaltung von NAG durch Lipasen unterschiedlicher Spezifität

NAG (0.05 mg/ml) wrd mit 20 µg partiell gereinigter HSL, 75 µg partiell gereinigter
 5 LPL aus Rattenadipozyten, 20 mU bakterieller Lipase, 50 mU pankreatischer Lipase,
 100 mU PLA₂ aus Schlangengift und 0.5 U PC-spezifischer Phospholipase aus

Bacillus cereus für 60 min inkubiert. Die Zunahme der Extinktion bei 481 nm wird
 bestimmt (n = 5, mean ± SD).

- 10 Ergebnis: Unter den gegebenen für HSL optimierten Bedingungen zeigten
 erwartungsgemäß die HSL (100 %) und LPL (etwa 70 %) die größte Aktivität. Die
 bakterielle und pankreatische Lipase ist deutlich weniger aktiv (25 bzw. 1 %),
 während die bakterielle PC-spezifische Phospholipase praktisch inaktiv war. Diese
 stark unterschiedlichen Aktivitäten zeigen die Spezifität der gewählten
 15 Bedingungen des indirekten NAG-Assays für die HSL, so werden z.B. in groben
 Zellextrakten eventuell enthaltene Phospholipasen nicht erfaßt. Diese Daten zeigen
 aber auch die prinzipielle Anwendbarkeit des Assayprinzips auf andere Lipasen.

Zunahme der Absorption bei 481 nm [arb. units]

20

| Enzym [arb. units] | HSL | LPL | Bacterial lip. | pancreatic lip. | PLA ₂ | PLC |
|-----------------------|------------|------------|-------------------|--------------------|------------------|--------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 143 ± 18 | 105 ± 14 | 36 ± 7 | 9 ± 2 | 1 ± 1 | 0 |
| 20 | 321 ± 28 | 187 ± 17 | 81 ± 10 | 14 ± 4 | 3 ± 2 | 1 ± 1 |
| 50 | 744 ± 58 | 489 ± 31 | 148 ± 18 | 39 ± 7 | 5 ± 1 | 2 ± 2 |
| 75 | 1023 ± 95 | 773 ± 56 | 238 ± 29 | 64 ± 10 | 8 ± 2 | 2 ± 1 |
| 100 | 1287 ± 165 | 948 ± 72 | 341 ± 39 | 92 ± 14 | 10 ± 2 | 3 ± 1 |
| 150 | 2106 ± 183 | 1487 ± 132 | 467 ± 57 | 140 ± 18 | 26 ± 6 | 3 ± 1 |
| 200 | 2697 ± 231 | 1952 ± 173 | 748 ± 70 | 188 ± 21 | 35 ± 9 | 5 ± 2 |
| 250 | 3321 ± 349 | 2638 ± 213 | 904 ± 83 | 234 ± 30 | 46 ± 12 | 5 ± 2 |
| 300 | 3855 ± 288 | 2945 ± 250 | 1056 ± 143 | 265 ± 34 | 54 ± 9 | 7 ± 3 |
| 400 | 4427 ± 402 | 3512 ± 288 | 1270 ± 187 | 286 ± 32 | 75 ± 11 | 10 ± 3 |

Beispiel 10: Spaltung verschiedener mit NBD-Fettsäure modifizierter Acylglyzeride durch HSL

- 5 NAG (0.05 mg/ml) oder verschiedene NBD-Fettsäure-modifizierte Lipide in unterschiedlichen Konzentrationen werden mit 20 µg partiell gereinigter HSL inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wird die Extinktion bei 481 nm bestimmt (n = 5, mean ± SD).

Ergebnis:

10

Zunahme der Absorption bei 481 nm (arb. units)

| Zeit [min] | NAG 0 | NAG 1 | NAG 2 | NAG 3 | NAG 4 | NAG 5 | NAG 6 |
|------------|------------|------------|------------|------------|----------|----------|--------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 39 ± 5 | 33 ± 4 | 13 ± 3 | 6 ± 2 | 2 ± 2 | 2 ± 2 | 1 ± 1 |
| 2 | 67 ± 9 | 59 ± 5 | 28 ± 6 | 15 ± 4 | 3 ± 2 | 5 ± 2 | 2 ± 1 |
| 5 | 158 ± 19 | 149 ± 15 | 69 ± 7 | 34 ± 5 | 5 ± 2 | 13 ± 3 | 2 ± 1 |
| 10 | 378 ± 41 | 341 ± 37 | 132 ± 18 | 61 ± 8 | 8 ± 3 | 28 ± 4 | 2 ± 2 |
| 15 | 561 ± 51 | 502 ± 49 | 234 ± 32 | 106 ± 18 | 13 ± 3 | 47 ± 7 | 3 ± 1 |
| 20 | 789 ± 93 | 711 ± 84 | 358 ± 49 | 149 ± 16 | 21 ± 4 | 63 ± 8 | 3 ± 1 |
| 30 | 1210 ± 193 | 1097 ± 143 | 603 ± 69 | 286 ± 21 | 32 ± 4 | 85 ± 10 | 4 ± 2 |
| 45 | 1784 ± 204 | 1690 ± 173 | 826 ± 55 | 405 ± 53 | 49 ± 5 | 132 ± 16 | 5 ± 2 |
| 60 | 2386 ± 234 | 2207 ± 231 | 1253 ± 186 | 577 ± 61 | 65 ± 9 | 173 ± 19 | 7 ± 3 |
| 75 | 2873 ± 259 | 2714 ± 269 | 1528 ± 162 | 734 ± 83 | 81 ± 11 | 226 ± 29 | 8 ± 3 |
| 90 | 3607 ± 402 | 3396 ± 376 | 1820 ± 197 | 1005 ± 125 | 105 ± 13 | 268 ± 38 | 10 ± 3 |
| 120 | 4312 ± 389 | 4056 ± 411 | 2496 ± 243 | 1384 ± 206 | 148 ± 19 | 325 ± 42 | 21 ± 3 |
| 180 | 4905 ± 423 | 4562 ± 496 | 3045 ± 412 | 1623 ± 188 | 227 ± 31 | 503 ± 51 | 24 ± 5 |

- 15 Beispiel 11: Hemmung der HSL durch Diisopropylphosphofluoridat

NAG (0.05 mg/ml) wird mit 20 µg partiell gereinigter HSL in Gegenwart steigender Konzentrationen and Diisopropylphosphofluoridat für 60 min inkubiert. In Aliquots der Reaktionsansätze wird die Zunahme der Extinktion bei 481 nm bestimmt (indirekter

- 20 NAG Assay), oder nach Extraktion mit Chloroform/Methanol die Menge an freigesetzter NBD-FA in der organischen Phase durch Fluorimetrie ermittelt (direkter NAG Assay). Alternativ werden Inkubationen der HSL mit [³H]Trioleoylglycerin als Substrat (s.o.) durchgeführt und die Menge freigesetzter radiomarkierter Ölsäure

nach Extraktion mit Chloroform/Methanol bestimmt. Die Spaltungsaktivität in Abwesenheit von Inhibitor wird für jeden Assay auf 100 % gesetzt ($n = 7$, mean \pm SD).

Ergebnis: In allen drei Assays ergaben sich typisch sigmoidale Hemmkurven für Diisopropylphosphofluoridat. Die daraus errechneten IC_{50} -Werte unterschieden sich für den indirekten (0.8 mM) oder direkten NAG Assay (1.1 mM) nicht signifikant voneinander. Für die Spaltung von Trioleoylglycerid errechnet sich mit 2.1 mM ein etwas höherer IC_{50} -Wert. Dies steht im Einklang mit den oben festgestellten Unterschieden in den Hemmwirkungen verschiedener Inhibitoren, die mit diesen Assays beobachtet werden (s. Beispiel 6 für mögliche Erklärungen). Unabhängig davon stehen die ermittelten IC_{50} -Werte für die Hemmung der HSL durch Diisopropylphosphofluoridat durch den indirekten NAG Assay in gutem Einklang mit publizierten Daten (P. Stralfors, H. Olsson, P. Belfrage, The Enzymes XVIII, 1987, 147-177; P. Stralfors, P. Belfrage, J. Biol. Chem. 258, 1983, 15146-15151; P. Belfrage, B. Jergil, P. Stralfors, H. Tornquist, FEBS Lett. 75, 1977, 259-263).

% maximal HSL Aktivität

| Conc. [mM] | NAG-Assay | Freigesetzte NBD-FA | TAG-Assay |
|------------|----------------|---------------------|----------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,01 | 98,9 \pm 5,3 | 99,6 \pm 4,6 | 99,4 \pm 6,2 |
| 0,02 | 96,2 \pm 5,1 | 97,4 \pm 5,0 | 98,8 \pm 5,9 |
| 0,05 | 92,1 \pm 4,1 | 94,3 \pm 4,4 | 97,5 \pm 5,1 |
| 0,1 | 84,3 \pm 5,1 | 88,4 \pm 5,1 | 95,1 \pm 4,5 |
| 0,2 | 74,5 \pm 6,3 | 79,2 \pm 4,9 | 89,5 \pm 5,3 |
| 0,5 | 61,5 \pm 5,7 | 67,4 \pm 5,3 | 78,9 \pm 6,4 |
| 1 | 44,6 \pm 4,4 | 53,8 \pm 4,9 | 66,3 \pm 5,7 |
| 2 | 27,8 \pm 3,1 | 38,6 \pm 3,4 | 51,9 \pm 4,4 |
| 5 | 16,5 \pm 2,5 | 24,7 \pm 2,8 | 36,7 \pm 4,9 |
| 10 | 10,6 \pm 1,7 | 13,6 \pm 1,9 | 22,6 \pm 3,5 |
| 20 | 5,7 \pm 1,3 | 7,7 \pm 1,5 | 11,8 \pm 1,9 |
| 50 | 3,5 \pm 1,1 | 4,5 \pm 1,2 | 6,4 \pm 1,3 |
| 100 | 2,5 \pm 0,8 | 2,7 \pm 0,6 | 3,1 \pm 0,4 |

Beispiel 12: Durchführbarkeit des indirekten NAG Assays im Mikrotiterplattenformat

NAG wird mit partiell gereinigter HSL in einem Assayvolumen von 200 µl in Wells von 96-Loch-Mikrotiterplatten für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Extinktion bei 481 nm wird in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät ermittelt.

Ergebnis: Unter den gewählten Bedingungen ist die Reaktion bis annähernd 60 min linear. Die Varianz (SD) liegt dabei zwischen 4 und 7 %. Damit ist der indirekte NAG Assay für den Einsatz im HT-Screening geeignet.

Zunahme der Absorption bei 481 nm [arb. units]

| Zeit [min] | Test: 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 50 | 48 | 61 | 49 | 56 | 52 | 57 | 49 |
| 2 | 97 | 89 | 107 | 95 | 101 | 116 | 93 | 89 |
| 5 | 238 | 269 | 278 | 243 | 277 | 248 | 235 | 241 |
| 10 | 487 | 534 | 462 | 458 | 552 | 508 | 488 | 460 |
| 15 | 713 | 768 | 709 | 712 | 789 | 780 | 735 | 718 |
| 20 | 978 | 1013 | 967 | 979 | 1097 | 1121 | 1045 | 966 |
| 30 | 1413 | 1579 | 1625 | 1690 | 1523 | 1688 | 1452 | 1410 |
| 45 | 2045 | 2134 | 2239 | 2106 | 2106 | 2238 | 1967 | 2145 |
| 60 | 2367 | 2541 | 2658 | 2755 | 2534 | 2608 | 2536 | 2690 |
| 75 | 2611 | 2894 | 2973 | 3023 | 2871 | 2879 | 2982 | 2895 |
| 90 | 2985 | 3244 | 3310 | 3355 | 3260 | 3122 | 3240 | 3125 |
| 120 | 3127 | 3469 | 3577 | 3601 | 3489 | 3378 | 3507 | 3320 |

Verwendete Abkürzungen:

| | |
|------------|---|
| arb. units | arbitrary units |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| FAB-MS | Fast atom bombardment mass spectrometry |

| | | |
|----|------------------|---|
| | HSL | hormon-sensitive Lipase |
| | K _p | Kaliumdihydrogenphosphat/Kaliumphosphatpuffer |
| | LPL | Lipoproteinlipase |
| | NAG | NBD-Monoacylglycerid: 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)- |
| 5 | | dodecansäure-2,3-dihydroxypropylester |
| | NBD | 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol |
| | NBD-FA | NBD-Fettsäure: 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)- |
| | | dodecansäure |
| | NIDDM | nicht-insulin-abhängiger Diabetes Mellitus |
| 10 | PLA ₂ | Phospholipase A ₂ |
| | PLC | Phospholipase C |
| | PNPB | <i>p</i> -Nitrophenylbutyrat |
| | SD | Standardabweichung |
| | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| 15 | TAG | [³ H]-Trioleoylglycerol |
| | Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| | TLC | Dünnschichtchromatographie |
| | TX-100 | Triton® X-100 |

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Substrats, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) eine mit einem Fluoreszenzlabel versehene Fettsäure mit 2,3-Epoxypropanol
5 zu einem Monoacylglycerid in alkoholischer Lösung bei Raumtemperatur unter Zusatz einer Base umsetzt,
 - b) dieses Monoacylglycerid mit Phospholipiden im Verhältnis von 1:10 bis 10:1 mg/ml einer Ultraschallbehandlung unterzieht, woraus das Substrat resultiert, das an einem Farbumschlag von gelb nach rot erkennbar ist.
- 10 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Fluoreszenzlabel Dansyl oder NBD ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei das Fluoreszenzlabel NBD ist.
- 15 4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, wobei die Fettsäure eine gesättigte oder ungesättigte Carbonsäure mit einer Kettenlänge von C-8 bis C-20 ist.
- 20 5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Fettsäure eine gesättigte C-12-Carbonsäure ist.
6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, wobei als Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol allein oder gemeinsam eingesetzt
25 werden.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol gemeinsam eingesetzt werden im Verhältnis 10 : 1 bis 1 : 10.
- 30 8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7, wobei das Monoacylglycerid 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-2,3-dihydroxypropylester ist.

9. Substrat hergestellt nach einem Verfahren der Ansprüche 1 bis 8.
- 5 10. Substrat gemäß Anspruch 9 zur Anwendung in einem Verfahren zur Identifizierung von Strukturen, die die Anordnung von Aromaten zu Charge-Transfer-Komplexen begünstigen.
- 10 11. Substrat gemäß Anspruch 9 zur Anwendung in einem Verfahren zur Identifizierung von Phospholipid/Lipidstrukturen.
12. Substrat gemäß Anspruch 9 zur Anwendung in einem Verfahren zur Identifizierung von Lipasen und Lipasehemmern.
- 15 13. Verfahren zur Herstellung des Monoacylglycerids 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-2,3-dihydroxypropylester, dadurch gekennzeichnet, daß man
12-Aminolaurinsäure zunächst mit 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol und anschließend das erhaltene Zwischenprodukt mit 2,3-Epoxypropanol in alkoholischer Lösung bei Raumtemperatur unter Zusatz einer Base umsetzt.
- 20 14. 12-(7-Nitro-benzo[1,2,3]oxadiazol-4-ylamino)-dodecansäure-2,3-dihydroxypropylester.
- 25 15. Verfahren zur Identifizierung von Lipasen und Lipasehemmern, dadurch gekennzeichnet, daß man
a) ein Substrat gemäß Anspruch 9 bereitstellt,
b) dieses Substrat mit einer Lipase inkubiert, und
c) die Farbänderung bestimmt.
- 30 16. Lipasen/Lipasehemmer, identifiziert durch ein Verfahren nach Anspruch 15.
17. Hochdurchsatz-Screening (HTS) zur Anwendung in einem Verfahren zur Identifizierung von Lipasen/Lipasehemmern gemäß Anspruch 15.

18. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen/Lipasehemmern, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) ein Substrat gemäß Anspruch 9 bereitstellt,
 - 5 b) dieses Substrat mit einer Lipase inkubiert,
 - c) die Geschwindigkeit der Farbänderung bestimmt und
 - d) die Aktivität ermittelt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man
- 10 das Substrat mit einer hormon-sensitiven Lipase inkubiert.
20. Assay System zur Identifizierung einer Lipase/eines Lipasehemmers enthaltend
- a) ein Substrat gemäß Anspruch 9,
 - 15 b) eine Ultraschallvorrichtung und gegebenenfalls
 - c) eine Vorrichtung zur visuellen/optischen und/oder fluorimetrischen Bestimmung der Farbänderung.
21. Assay System zur Bestimmung der Aktivität einer Lipase/eines
- 20 Lipasehemmers enthaltend
- a) ein Substrat gemäß Anspruch 9,
 - b) eine Ultraschallvorrichtung,
 - c) eine Vorrichtung zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Farbänderung und
 - 25 d) eine Vorrichtung zur Absorptions- oder Fluoreszenzmessung.
22. Assay System gemäß Anspruch 20 oder 21 in Form eines Kits.
23. Kit gemäß Anspruch 22, wobei der Assay ein Lipase-Assay ist.
- 30 24. Kit gemäß Anspruch 22 enthaltend
- a) ein Substrat gemäß Anspruch 9 und
 - b) ein Behältnis.

25. Verfahren zur Bestimmung der Detergenzwirkung oder der Cytotoxizität von Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) ein Substrat gemäß Anspruch 9 bereitstellt,
 - b) dieses Substrat mit einer Testverbindung inkubiert, und
 - c) die Farbänderung von rot nach gelb, die cytotoxische Verbindungen und Verbindungen mit Detergenzwirkung kennzeichnen, visuell/optisch oder fluorimetrisch bestimmt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/03308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/533 G01N33/58 C07D271/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07D C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | EP 0 253 271 A (ABBOTT LAB) 20 January 1988 (1988-01-20) claims page 3, line 3 -page 4, line 12 page 14, line 3 -page 15, line 5 | 1-25 |
| X | TING ET AL: "An improved synthesis of 7-nitroben-2-oxa-1,3-diazole analogs of CDP-diacylglycerol and phosphatidylinositol" CHEM. PHYS. LIPIDS, vol. 60, no. 1, 1991, pages 83-91, XP000937528 the whole document | 1-25 |

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 2000

Date of mailing of the international search report

19/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/03308

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | MULLER G (REPRINT) ET AL: "Analysis of lipid metabolism in adipocytes using a fluorescent fatty acid derivative.1. Insulin stimulation of lipogenesis" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-LIPIDS AND LIPID METABOLISM, (12 JUL 1997) VOL. 1347, NO. 1, PP. 23-39. PUBLISHER: ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS. ISSN: 0005-2760., XP000937689 HOECHST MARION ROUSSEL, PHARMACEUT RES SITE, DG METAB, BLDG H825, D-65926 FRANKFURT, GERMANY (Reprint) the whole document --- | 1-8 |
| A | SKLAN D ET AL: "ASSOCIATION OF ACYL GLYCERIDE AND RETINYL PALMITATE HYDROLASE ACTIVITIES WITH ZINC AND COPPER METALLO PROTEINS IN A HIGH MOLECULAR WEIGHT LIPID PROTEIN AGGREGATE FRACTION FROM CHICK LIVER CYTOSOL" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 711, no. 3, 1982, pages 532-538, XP000937676 ISSN: 0006-3002 abstract; table II ----- | 1,9-12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/03308

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0253271 A | 20-01-1988 | US 4784961 A | 15-11-1988 |
| | | CA 1324145 A | 09-11-1993 |
| | | CA 1335252 A | 18-04-1995 |
| | | DE 3786043 A | 08-07-1993 |
| | | DE 3786043 T | 25-11-1993 |
| | | JP 1952459 C | 28-07-1995 |
| | | JP 6078328 B | 05-10-1994 |
| | | JP 63088171 A | 19-04-1988 |
| | | JP 1922191 C | 07-04-1995 |
| | | JP 5208965 A | 20-08-1993 |
| | | JP 6044001 B | 08-06-1994 |
| | | US 5223627 A | 29-06-1993 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03308

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/533 G01N33/58 C07D271/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C07D C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | EP 0 253 271 A (ABBOTT LAB) 20. Januar 1988 (1988-01-20) Ansprüche Seite 3, Zeile 3 -Seite 4, Zeile 12 Seite 14, Zeile 3 -Seite 15, Zeile 5 --- | 1-25 |
| X | TING ET AL: "An improved synthesis of 7-nitroben-2-oxa-1,3-diazole analogs of CDP-diacylglycerol and phosphatidylinositol" CHEM. PHYS. LIPIDS, Bd. 60, Nr. 1, 1991, Seiten 83-91, XP000937528 das ganze Dokument --- -/-- | 1-25 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. September 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Routledge, B

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | MULLER G (REPRINT) ET AL: "Analysis of lipid metabolism in adipocytes using a fluorescent fatty acid derivative.1. Insulin stimulation of lipogenesis" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-LIPIDS AND LIPID METABOLISM, (12 JUL 1997) VOL. 1347, NO. 1, PP. 23-39. PUBLISHER: ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS. ISSN: 0005-2760., XP000937689 HOECHST MARION ROUSSEL, PHARMACEUT RES SITE, DG METAB, BLDG H825, D-65926 FRANKFURT, GERMANY (Reprint) das ganze Dokument | 1-8 |
| A | SKLAN D ET AL: "ASSOCIATION OF ACYL GLYCERIDE AND RETINYL PALMITATE HYDROLASE ACTIVITIES WITH ZINC AND COPPER METALLO PROTEINS IN A HIGH MOLECULAR WEIGHT LIPID PROTEIN AGGREGATE FRACTION FROM CHICK LIVER CYTOSOL" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 711, Nr. 3, 1982, Seiten 532-538, XP000937676 ISSN: 0006-3002 Zusammenfassung; Tabelle II | 1,9-12 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03308

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0253271 A | 20-01-1988 | US 4784961 A | 15-11-1988 |
| | | CA 1324145 A | 09-11-1993 |
| | | CA 1335252 A | 18-04-1995 |
| | | DE 3786043 A | 08-07-1993 |
| | | DE 3786043 T | 25-11-1993 |
| | | JP 1952459 C | 28-07-1995 |
| | | JP 6078328 B | 05-10-1994 |
| | | JP 63088171 A | 19-04-1988 |
| | | JP 1922191 C | 07-04-1995 |
| | | JP 5208965 A | 20-08-1993 |
| | | JP 6044001 B | 08-06-1994 |
| | | US 5223627 A | 29-06-1993 |
| | | | |